

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske
dijagnostike**

Juraj Kirchofer

**ANALIZA RAZINE EKSPRESIJE PROTEINA
GAPDH, Akt i p53 U STANICAMA
IZLOŽENIM N-SULFONILUREAMA
METODOM WESTERN BLOT**

Završni rad

Osijek, 2017.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Prediplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske
dijagnostike**

Juraj Kirchofer

**ANALIZA RAZINE EKSPRESIJE PROTEINA
GAPDH, Akt i p53 U STANICAMA
IZLOŽENIM *N*-SULFONILUREAMA
METODOM WESTERN BLOT**

Završni rad

Osijek, 2017.

Rad je ostvaren u Laboratoriju za kulturu tkiva i funkcionalnu genomiku pri Katedri za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta Osijek.

Mentorica: prof. dr. sc. Ljubica Glavaš – Obrovac

Broj listova : 28

Broj slika: 10

Broj tablica: 8

Broj literaturnih navoda: 23

Jezik izvornika: hrvatski

Zahvala

U prvom redu zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Ljubici Glavaš – Obrovac na utrošenom vremenu, strpljenju, savjetima i ukazanoj prilici da zakoračim u svijet znanosti.

Posebno zahvaljujem dr.sc. Marijani Jukić mag. biol. na pomoći, potpori, savjetima i stalnoj dostupnosti tijekom provedbe istraživanja, ali i pisanja rada.

Velika hvala svim profesorima, docentima, asistentima od kojih sam svakoga dana imao prilike učiti i razvijati se u znanstvenom svijetu. Naravno hvala i svim kolegama i kolegicama koji su preddiplomski studij učinili zanimljivim i zabavnim.

Zahvalu dugujem i svima koji su mi bili potpora tijekom preddiplomskog studija osobito roditeljima, braći, djevojci i čitavoj obitelji koja je svakoga dana bila uz mene i bodrila me tijekom studiranja.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Protutumorski potencijal purinskih analoga	1
1.2. Glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaza (engl. <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> , GAPDH)	2
1.3. Protein kinaza B/Akt (engl. <i>protein kinase B or Akt</i> , PKB/Akt)	3
1.4. Tumorski protein p53 (engl. <i>tumor protein p53</i> , p53)	4
2. HIPOTEZA	5
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	6
4. MATERIJALI I METODE	7
4.1. Materijali	7
4.1.1. Derivati N-9 sulfonil purina	7
4.1.2. Stanične linije	7
4.1.3. Kemikalije	8
4.2 Metode	9
4.2.1. Rad sa staničnim kulturama	9
4.2.2. Kultura stanica in vitro	9
4.2.3. Izolacija proteina	10
4.2.4. Natrij dodecil sulfat poliakrilamid gel elektroforeza (engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , SDS-PAGE)	11
4.2.5. Prijenos proteina na membranu	13
4.2.6. Imunodetekcija proteina na membrani	15
4.2.7. Relativna kvantifikacija proteina na membrani	16
5. REZULTATI	17
6. RASPRAVA	20
7. ZAKLJUČAK	22
8. SAŽETAK	23
9. SUMMARY	24
10. LITERATURA	25
11. ŽIVOTOPIS	28

POPIS KRATICA :

ADP (engl. *Adenosine diphosphate*) – adenzin difosfat

APS (engl. *Ammonium persulfate*) – amonij persulfat

BSA (engl. *bovine serum albumin*) – goveđi serumski albumin

Cdk (engl. *Cyclin-dependent kinases*) – kinaza ovisna o ciklinima

Chk2 (engl. *Serine/threonine-protein kinase*) – serin/treonin protein kinaza

DAB (engl. *3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride*) - 3,3-diaminobenzidin tetrahidroklorid

DMSO (engl. *dimethyl sulfoxide*) – dimetil sulfoksid

DNA (engl. *deoxyribonucleic acid*) – deoksiribonukleinska kiselina

EDTA (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*) – etilendiamintetraoctena kiselina

FADH (engl. *flavin adenine dinucleotide*) – flavin adenin dinukleotid

GAPDH (engl. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) – gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza

NADH (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide*) – nikotinamid adenin dinukleotid

NO (engl. *nitrogen oxide*) – dušikov (II) oksid

p53 (eng. *tumor protein p53*) – tumorski protein p53

PBS (engl. *phosphate-buffered saline*) – fosfat puferirana fiziološka otopina

PKB/Akt (engl. *Protein kinase B or Akt*, PKB/Akt) – protein kinaza B/Akt

PMSF (engl. *phenylmethylsulfonyl fluoride*) – fenilmetilsulfonil fluorid

PNA (engl. *purine nucleoside analog*) – purinski nukleozidni analozi

PVDF (engl. *polyvinylidene difluoride*) – Polivinilidenfluorid

RNA (engl. *ribonucleic acid*) – ribonukleinska kiselina

SDS (engl. *Sodium dodecyl sulfate*) – natrij dodecil sulfat

TBST (engl. *mixture of tris-buffered saline (TBS) and Tween 20*) – mješavina tris puferirane fiziološke otopine i spoja Tween 20

TEMED (engl. *tetramethylethylenediamine*) – tetrametiletilendiamin

Tris (engl. *(hydroxymethyl)aminomethane*) – hidroksilmetil aminometan

1. UVOD

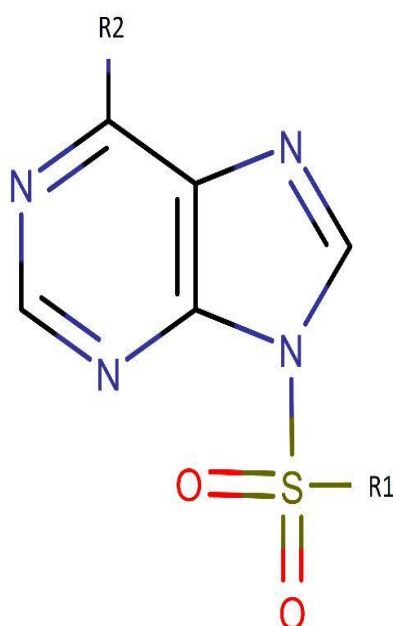
Tumorske bolesti, kao posljedica zagađenja okoliša i starenja svjetske populacije, predstavljaju vodeće uzročnike smrtnosti u modernom svijetu. Maligne bolesti neke su od velikih javnozdravstvenih problema i golemi teret društvu. Zbog navedenih razloga prisutna je velika potreba za pronalaskom protutumorskih lijekova koji će pokazivati selektivnu inhibiciju rasta tumorskih stanica u odnosu na normalne, zdrave stanice (1). Razvoj i progresija tumora ovisni su o brojnim čimbenicima među kojima se ističu promjene u strukturi i funkciji gena i njihovih proteinskih produkata. Stanični ciklus normalnih stanica reguliran je nizom gena, proto-onkogenima i tumor supresorskih gena (antionkogeni), koji djeluju na različitim razinama kao što su stanični rast, proliferacija i diferencijacija stanice. Mutirani proto-onkogeni – onkogeni geni su čije mutacije dovode do povećanja funkcije genskih produktata koji uobičajeno potiču staničnu proliferaciju. Za razliku od njih, tumor supresori su geni čiji produkti ograničavaju staničnu proliferaciju (progresija staničnog ciklusa, usmjeravanje stanice u apoptozu, održavanje stabilnosti genoma i niske razine prisutnih mutacija). Njihovi mutirani oblici gube svoju kontrolnu funkciju i u tom slučaju dolazi do nesmetane proliferacije stanica tumora (2). Modificirani nukleozidi i nukleobaze predmet su mnogih istraživanja zbog svoje potencijalne, ali i dosada klinički dokazane protutumorske i protuvirusne aktivnosti. Unatoč pokazanom potencijalu, podatci o biološkom djelovanju *N*-sulfonilnih derivata purinskih nukleobaza slabo su zastupljeni u literaturi i iz tih razloga potrebno je detaljnije istražiti njihovo protutumorsko djelovanje.

1.1. Protutumorski potencijal purinskih analoga

Kemijskom modifikacijom nukleobaza koje se uobičajeno ugrađuju u nukleinske kiseline nastoji se zaustaviti progresija brzo proliferirajućih stanica, kao što su tumorske stanice, kroz stanični ciklus. Rezultati studija bioloških učinaka pirimidinskih derivata *N*-sulfonilurea pokazali su značajan protutumorski potencijal (3). Iz tog razloga sintetizirani su novi purinski derivati *N*-9 sulfonilurea, koji su istraživani u ovom radu. Purinski nukleozidni analozi (engl. *purine nucleoside analog*, PNA) prema farmakološkom djelovanju heterogena su skupina koja pokazuje citotoksično, antivirusno i imunosupresivno djelovanje. PNA u kemoterapijskom smislu pripadaju skupini antimetabolita (4). Novosintetizirani PNA kemijski su modificirani s nakanom da oponašaju ulogu fizioloških nukleozida u staničnom metabolizmu. Uneseni u DNA ili RNA molekule, mogu inhibirati replikaciju ili ometati

djelovanje enzima DNA i RNA polimeraze, kinaze, ribonukleotid reduktaze, DNA metiltransferaze i purin nukleozid fosforilaze. PNA ulaze u stanicu preko nukleozidnih transportera. Nukleozidni transporteri imaju važnu ulogu u ostvarenju citotoksičnosti kao i razvoju otpornosti tumorskih stanica na antitumorsku terapiju. Ugradnjom PNA u DNA zaustavlja se stanični ciklus tijekom S faze staničnog ciklusa. *N*-sulfonilni purinski analozi derivati su dviju biološki aktivnih komponenti : sulfonilciklouree i purinske baze.

Istraživani derivati *N*-9 sulfonilurea, čija je opća struktura prikazana na Slici 1., pokazuju citotoksične učinke na leukemijskim i karcinonskim staničnim linijama (1), pa je iz toga razloga zanimljivo ispitati mehanizam citotoksičnih učinaka.



Slika 1. Osnovna molekulska struktura novosintetiziranih *N*-9 sulfonilurea

1.2. Glicerinaldehid-3-fosfat dehidrogenaza (engl. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, GAPDH)

GAPDH je homotetramer koji sadrži četiri jednake 37 kDa podjedinice. Lokaliziran je u 12-om kromosomu. Također je enzim koji katalizira reverzibilnu reakciju pretvorbe glicerinaldehid-3-fosfata u 1,3-difosfoglicerat u procesu glikolize. Osim svoje metaboličke funkcije, sudjeluje i u različitim staničnim procesima kao što su replikacija i popravak DNA, endocitoza, metabolizam željeza, karcinogenezi i apoptozi stanica (5). Često se koristi kao kontrolni protein prilikom istraživanja, a u te svrhe će se koristiti i tijekom ovog istraživanja. Reguliran je na transkripcijskoj razini, a njegova funkcionalna raznolikost uglavnom utječe na posttranslacijske modifikacije u različitim aminokiselinama. Mnoge molekule ne samo da

reguliraju koncentraciju mRNA nego utječu i na stanične funkcije kao što su proliferacija, stvaranje tumora, kemorezistencija. U slučaju karboksilacije GAPDH s dušikovim (II) oksidom (engl. *nitrogen oxide*, NO) dolazi do njegova premještanja u jezgru i do početka apoptoze (5). GAPDH se smatra pro-apoptičkim proteinom, no ono što je paradoksalno jest činjenica da je utvrđena prekomjerna ekspresija GAPDH i u mnogim vrstama ljudskih karcinoma i često se njegova prekomjerna ekspresija povezuje sa smanjenim preživljenjem. Prethodna istraživanja pokazala su da GAPDH regulira nekoliko čimbenika povezanih s razvojem tumora. Posttranslacijske modifikacije kao što su fosforilacija, ADP ribozilacija i acetilacija uključene su u korištenje normalnih putova stanice u svrhu razvoja, progresije i širenja stanice raka. GAPDH može biti kritičan regulator funkcije tumorskih stanica, marker progresije i prognoze karcinoma (6). Postoje brojna istraživanja koja potvrđuju tezu da GAPDH ima bitnu ulogu i započinje apoptozu stanice, no isto tako sudjeluje u prekomjernoj proliferaciji stanice, tj. štiti stanice od stanične smrti u situaciji kada je aktivacija kaspaza ili blokirana ili poremećena. Ekspresija GAPDH raznolika je u različitim staničnim linijama. U literaturi je dokumentirana prisutnost ekspresije GAPDH u HeLa, CaCo-2, NCI-H358, K562 i Raji staničnim linijama koje će se koristiti prilikom provođenja istraživačkog rada (5, 6).

1.3. Protein kinaza B/Akt (engl. *protein kinase B or Akt*, PKB/Akt)

PKB/Akt je serin/treonin specifična protein kinaza koja kod sisavaca sadrži tri visoko homologna člana poznata kao PKB- α (Akt1), PKB- β (Akt2) i PKB- γ (Akt3). PKB/Akt aktivira se u stanicama izloženim različitim stimulansima kao što su hormoni, čimbenici rasta i komponente izvanstanične tekućine. Sudjeluje u različitim staničnim procesima kao što su metabolizam glukoze, apoptoza, proliferacija stanice, transkripcija i stanična migracija. Akt1 sudjeluje u putevima staničnog opstanka inhibirajući proces apoptoze. S obzirom na mogućnost blokiranja apoptoze, identificira se kao onkogen, tj. jedan je od glavnih čimbenika u razvijanju karcinoma. Osim toga posjeduje sposobnost induciranja proteinske sinteze i zbog toga je jedan od ključnih proteina u procesima koji dovode do hipertrofije skeletnih mišića i rasta tkiva. Akt2 je važna signalna molekula u inzulinskom signalnom putu, dok sama funkcija Akt3 nije u potpunosti poznata. Mnoga istraživanja upućuju da je PKB/Akt često aktivan u različitim vrstama karcinoma kod ljudi. PKB/Akt aktivacija može se pojaviti zbog pojačane ekspresije ili kao posljedica mutacija u komponentama signalnog puta. Kao što je navedeno, smatra se da PKB/Akt aktivacija inhibira proces apoptoze i omogućuje pojačanu proliferaciju i rast karcinoma (7). U literaturi se navodi prisutnost ekspresije PKB/Akt

proteina u HeLa, CaCo-2, NCI-H358, K562 i Raji staničnim linijama koje će se koristiti u izradi ovog istraživačkog rada (8, 9).

1.4. Tumorski protein p53 (engl. *tumor protein p53*, p53)

Gen *p53* je tumor supresorski gen čija aktivnost zaustavlja stvaranje tumora. Gen *p53* nalazi se na 17-om kromosomu. Ima glavnu ulogu u regulaciji kontrolne točke u G₁ fazi. Stabilizira se fosforilacijom preko serin/treonin protein kinaze (engl. *serine/threonine-protein kinase*, Chk2). U stanici veže DNA, što potiče stimulaciju ekspresije drugog gena kako bi se proizveo protein zvan p21, koji potom inhibira protein kinazu ovisnu o ciklinima (engl. *cyclin-dependent kinases*, Cdk) koja potiče staničnu diobu (10). Kada je protein p21 u interakciji s Cdk, stanica ne može proći do sljedeće faze diobe stanica. Ako dođe do mutacije, mutirani p53 više ne može vezati DNA na djelotvoran način te ne aktivira transkripciju proteina p21 (11). Shodno tome, inhibirana je njegova učinkovitost kao „stop signala“ u staničnom ciklusu u G₁ fazi. U tom slučaju stanice se nekontrolirano dijele i dolazi do nastanka tumora. Mutacije u genu *p53* nalaze se u većini tipova tumora i tako doprinose kompleksnoj mreži molekularnih događaja koji dovode do formiranja tumora (12). Tijekom godina istraživanja na miševima koji su korišteni kao model za istraživanje tumorskih oboljenja čovjeka, došlo se do važnih informacija o genu *p53*, koje odražavaju njegovu ključnu ulogu u patogenezi ljudskih karcinoma. Ekspresija proteina p53 u HeLa, CaCo-2, NCI-H358, K562 i Raji staničnim linijama različita je. Istraživanja su pokazala kako ekspresija p53 proteina nije prisutna u NCI-H358 i K562 staničnim linijama (12, 14, 15, 16). Stanična linija Raji u manjoj mjeri sadrži nemutirani oblik (13), dok stanična linija HeLa sadrži mutirani oblik gena *p53* također prisutan u manjoj mjeri (17, 18). Prema literaturi, ekspresija proteina p53 očekivana je i u CaCo-2 staničnoj liniji unatoč mutacijama i inaktivnosti gena (19).

2. HIPOTEZA

Razina ekspresije proteina GAPDH, Akt i p53 u HeLa, CaCo-2, NCI-H358, K562 i Raji staničnim kulturama izloženima purinskim derivatima *N*-sulfonilurea bit će povišena.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA :

- Odrediti moguće promjene u ekspresiji GAPDH, Akt i p53 proteina u staničnim kulturama HeLa, CaCo-2, NCI-H358, K562 i Raji nakon tretmana s novim derivatima *N*-sulfonilurea, spojevima D7-23 i R-191.
- Usporediti rezultate ekspresije proteina GAPDH, Akt i p53 u staničnim kulturama HeLa, CaCo-2, NCI-H358, K562 i Raji tretiranih spojevima D7-23 i R-191 s ekspresijom navedenih proteina u netretiranim (kontrolnim) stanicama.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Materijali

4.1.1. Purinski derivati *N*-9 sulfonilurea

Purinski derivati *N*-9 sulfonilurea sintetizirani su u Laboratoriju za supramolekularnu i nukleozidnu kemiju Zavoda za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu. Za potrebe *in vitro* testiranja novosintetizirani spojevi otopljeni su u dimetil sulfoksidu (engl. *dimethyl sulfoxide*, DMSO) kao 1×10^{-2} mol/L koncentrirane otopine i pohranjeni na -20°C . Neposredno prije testiranja pripremljene su radne otopine otapanjem stock otopine (1×10^{-2} mol/L) u mediju za uzgoj stanica. Prema pokazanoj topljivosti u destiliranoj vodi, definirane su radne koncentracije za pojedine novosintetizirane spojeve.

4.1.2. Stanične linije

Biološki učinak novosintetiziranih *N*-9 sulfonilurea testiran je na komercijalno dostupnim humanim staničnim linijama. U radu su korištene adherentne stanične linije:

- HeLa (ATCC[®] CCL-2[™]) humane epitelne stanice karcinoma cerviksa
- CaCo-2 (ATCC[®] HTB-37[™]) epitelne stanice humanog karcinoma kolona
- NCI-H358 (ATCC[®] CRL-5807[™]) epitelne stanice bronhioalveolarnog karcinoma

HeLa je najstarija i najčešće korištena adherentna, humana stanična linija. Uzgojena je iz tkiva raka vrata maternice izuzetog od Henriette Lacks, po kojoj je i dobila ime. HeLa je bila prva stanična linija koja je preživjela nekoliko dana, te je daljnjim istraživanjem postala neophodna u razvoju medicine.

CaCo-2 stanična linija uzgojena je iz humanog epitelnog kolorektalnog adenokarcinoma. Ta stanična linija odlikuje se velikom heterogenošću stanica.

NCI-H358 stanična linija potječe od bronhioalveolarnog karcinoma.

Korištene su i stanične linije leukemija i limfoma čovjeka :

- K562 (ATCC[®] CCL-243[™]) kronična mijeloidna leukemija u blastičnoj krizi.
- Raji (ATCC[®] CCL-86[™]) B-limfocitni Burkitt-ov limfom.

K562 je prva izolirana stanična linija humane mijeloidne leukemije.

Raji je prva humana stanična linija izolirana iz hematopoetskog tkiva. Stanična linija nastala je uzgojem humanih limfocita transformiranih Epstein-Barr virusom. Raji i K562 su stanice u suspenziji.

4.1.3. Kemikalije

Za izvođenje pokusnog dijela ovog rada korištene su kemikalije i reagensi različitih proizvođača : Dulbecco modificirani Eagleov medij (DMEM, Lonza, Basel, Switzerland), Roswell Park Memorial Institute medij (RPMI 1640, Lonza, Basel, Switzerland), fetalni goveđi serum (FBS, GIBCO Invitrogen, Paisley, Velika Britanija), 0,25 % tripsin EDTA (GIBCO Invitrogen, Paisley, Velika Britanija), Na-piruvat (GIBCO Invitrogen, Paisley, Velika Britanija), penicilin/streptomycin 100 x (GIBCO Invitrogen, Paisley, Velika Britanija), Tripansko plavilo 0,4 % (GIBCO Invitrogen, Paisley, Velika Britanija), L-glutamin 200 mM (GIBCO Invitrogen, Paisley, Velika Britanija), HEPES-4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), SDS natrij dodecil sulfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) i DMSO dimetil sulfoksid (Acros Organics, New Jersey, SAD). Fosfatni pufer (PBS, engl. phosphate buffered saline) pripremljen je od 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 1,76 mM KH₂PO₄, i titriran do pH 7,4. Nadalje, korišteni su Tris i NaCl (Kemika, Zagreb, Hrvatska), Etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, SAD), glicin (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), Met-OH (New Jersey, SAD), Tween20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), nemasno mlijeko u prahu (Kalifornija, SAD), 3,3'-Diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), goveđi serumski albumin (BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), metilensko plavilo (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD), β-merkaptotanol (Acros Organics, New Jersey, SAD), akrilamidni mix (Biorad, Kalifornija, SAD) i tetrametiletilediamin (TEMED, Biorad, Kalifornija, SAD).

4.2 Metode

Western blot metoda je identifikacije određenih proteina ili određivanje važnih obilježja proteinskih antigena iz otopine proteina ekstrahiranih iz stanica. Metoda se sastoji od tri postupka: 1. elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (engl. *polyacrylamide gel electrophoresis*; PAGE), 2. prijenos proteina na membranu, 3. imunodetekcija proteina na membrani. Prije samog provođenja metode potrebno je izolirati stanice iz kulture stanica. Nakon izolacije stanica provodi se liza stanica (20).

4.2.1. Rad sa staničnim kulturama

Rad sa staničnim kulturama odvija se u kabinetu za rad u sterilnim uvjetima s laminarnim protokom zraka. Posuđe, pribor, otopine, puferi i mediji moraju biti sterilni.

Održavanje stanične kulture :

Stanice su uzgajane u bocama za kulturu stanica površine rasta 25 cm^2 (BD, Falcon, Njemačka) u CO_2 inkubatoru (IGO 150 CELLlife™, JOUAN, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) u uvjetima ($37\text{ }^\circ\text{C}$, $5\%\text{ CO}_2$) u atmosferi zasićenoj vlagom. Adherentne stanične linije (HeLa, CaCo-2, NCI-H358) uzgojene su u T-bocama prilagođenim kultivaciji stanica koje prijanjaju za podlogu. Stanične linije leukemija i limfoma (K562 i Raji) uzgojene su u T-bocama za uzgoj staničnih linija u suspenziji (21).

Stanične linije koje rastu u suspenziji održavaju se oduzimanjem dijela volumena i nadoknadom svježim medijem ili zamjenom ukupnog volumena medija. Konfluentnost stanica svakodnevno je provjeravana pod inverznim mikroskopom (Zeiss Axiovert 25, Njemačka).

4.2.2. Kultura stanica *in vitro*

Stanice su nasadene u bočice za uzgoj stanica u koncentraciji od 1×10^6 stanica za adherentne za HeLa, CaCo-2 i NCI-H358 i 5×10^6 stanica za K562 i Raji stanice, u volumenu od 5 ml. Adherentne stanice (HeLa, CaCo-2 i NCI-H358) inkubirane su preko noći u CO_2 inkubatoru na $37\text{ }^\circ\text{C}$ kako bi se prihvatile za podlogu. Stanice su tretirane s D7-23 i R-191 spojevima u finalnim koncentracijama $2 \times 10^{-6}\text{ M}$ za K562 i Raji stanice, odnosno $5 \times 10^{-6}\text{ M}$ za HeLa, CaCo-2 i NCI-H358 stanice (21).

4.2.3. Izolacija proteina

Iz kulture adherentnih stanica uklonjen je medij, a površina boce isprana je s 5 ml fosfatnog pufera (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS). Adherentne stanice odvojene su od podloge primjenom enzima tripsina. Dodano je 3 ml 0,25 % otopine tripsin/etilendiamintetraocten kiseline (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA). Nakon 5 minuta tripsin je inaktiviran dodatkom 5 ml svježeg medija, a stanična suspenzija dobro resuspendirana propuhivanjem kroz pipetu. U konačnici stanice su pomoću medija pokupljene u Falcon epruvetu. Stanice u suspenziji su zajedno s medijem za uzgoj prenesene u Falcon epruvetu. Stanice su centrifugirane na 600 g, 4 min pri 4 °C. Nakon centrifugiranja, uklonjen je supernatant i stanice u talogu dodatno su isprane u PBS-u. Uzorak izoliranih stanica stavljen je u tubicu od 2 ml, zatim je dodano 980 µl pufera za lizu stanica i 20 µl fenilmetilsulfonil fluorida (engl. *phenylmethylsulfonyl fluoride*, PMSF) (10 mg/ml otapa se u Et-OH). PMSF se dodaje neposredno prije homogenizacije jer se raspada u H_2O . PMSF djeluje kao inhibitor proteaza. Uzorak i reagensi inkubirani su na ledu 45 minuta, te centrifugirani 15 minuta na +4 °C pri brzini od 12 000 g. Bistri volumen supernatanta, slobodan od masti i taloga, alikvotiran je u volumenu od 20 µL u više novih tubica. Alikvotirani uzorci uskladišteni su na -80 °C do korištenja (izbjegavano odmrzavanje i ponovno zamrzavanje) (21).

Tablica 1. Priprema pufera za lizu stanica

Kemikalije	Konačna koncentracija
hidroksimetil aminometan (engl. <i>(hydroxymethyl)aminomethane</i> , Tris) pH 7	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	2 mM
SDS	1 %

4.2.4. Natrij dodecil sulfat poliakrilamid gel elektroforeza (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE)

Natrij dodecil sulfat poliakrilamid gel elektroforeza proces je razdvajanja proteina na temelju razlike u njihovoj masi. SDS (anionski detergent) daje negativan naboj svim proteinima u prisutnosti reagensa za kidanje disulfidnih veza. Pokretljivost je obrnuto proporcionalna relativnoj molekulskoj masi (20).

POSTUPAK :

Složena stakla stavljena su na postolje za izlijevanje gelova. Pripremljeni su reagensi za pripremu donjeg gela (*Tablica 2.*) te je dodano oko 5 ml između stakala. Dodan je 1 ml izopropanola i ostavljen kako bi se odvio proces polimerizacije kroz 45 minuta. Tijekom procesa polimerizacije pripremljena je otopina za gornji gel (*Tablica 3.*). Nakon polimerizacije, nadodan je izopropanol i ispran destiliranom vodom, potom pažljivo posušena površina gornjeg gela pazeći na površinu donjeg gela. Potom je izliven gornji gel do ruba i umetnut češalj. Pričekano je 45 minuta za polimerizaciju gornjeg gela. Nakon polimerizacije češalj je maknut te je sustav elektroforeze posložen do kraja. Nakon dodavanja pufera za elektroforezu (*Tablica 4.*), pokrenut je proces nanošenja uzoraka u jažice. Uzorci ukupnih staničnih proteina su prethodno pomiješani s puferom za nanošenje uzoraka (*Tablica 5.*) u omjeru 1:3 i zagrijani u termobloku 70 °C tijekom 10 minuta. U prvu jažicu nanesen je proteinski standard (smjesa proteina poznatih molekularnih masa). U ostale jažice pipetirani su uzorci, pazeći da dodani volumen ne prijeđe volumen jažice. Puštena je elektroforeza pri naponu od 200 V sve dok uzorci nisu stigli do granice gornjeg i donjeg gela (*Slika 1.*), a potom je napon od 100 V održavan sve dok fronta boje pufera nije dostigla donji rub gela (1 – 1,5 h) (*Slika 2.*).

PRIPREMA POLIAKRILAMIDNIH GELOVA :*Tablica 2. Priprema donjeg gela*

DONJI GEL – 8 %
30 % akrolamid mix
1,5 M Tris (pH 8,8)
10 % SDS
10 % amonij persulfat (APS)
TEMED

Tablica 3. Priprema gornjeg gela

GORNJI GEL – 5 %
30 % akrolamid mix
1,5 M Tris (pH 6,8)
10 % SDS
10 % APS
tetrametiletilendiamin (TEMED)

Tablica 4. Priprema pufera za elektroforezu

PUFER ZA ELEKTROFOREZU : 10 x Stock, pH 8,3
Tris base
Glicin
SDS

Tablica 5. Priprema pufera za nanošenje uzoraka na gel

PUFER ZA NANOŠENJE UZORAKA NA GEL	
Kemikalije	Finalna koncentracija
Tris (pH 6,5)	50 mM
β – merkaptotetanol	1 %
Glicerol	10 %
Bromfenol plavilo	0,5 mg/ml
SDS	2 %

*Slika 1. Početak elektroforeze**Slika 2. Proces elektroforeze*

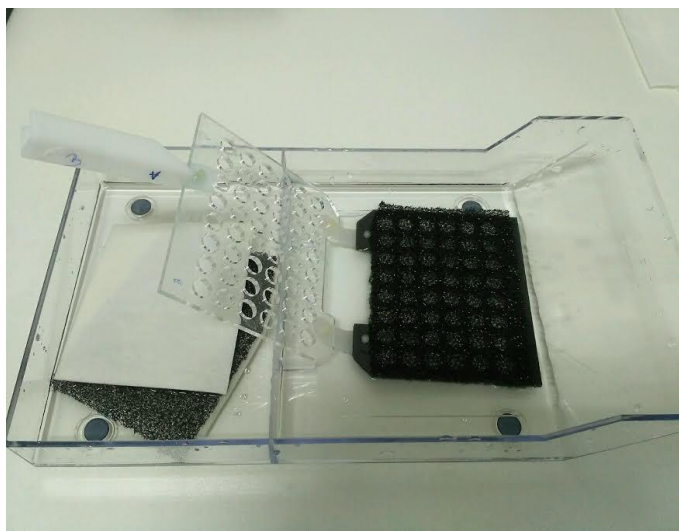
4.2.5. Prijenos proteina na membranu

POSTUPAK :

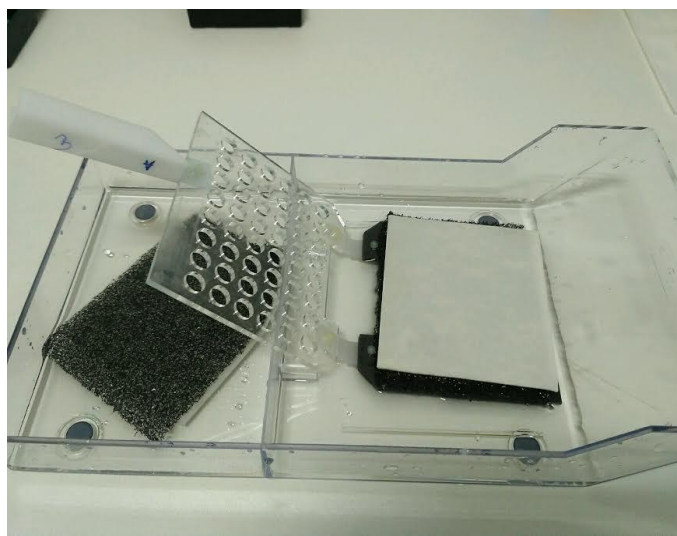
Nakon završenog bojanja gela, gel je ispran u puferu za prijenos (*Tablica 6.*) kako bi se uklonili ostaci soli i deterdženta. Poliviniliden difluorid (engl. *polyvinylidene difluoride*, PVDF) membrana je izrezana prema dimenzijama gela. Membrana za prijenos pripremljena je prema uputama proizvođača. Filter papiri izrezani su (4 komada) prema veličini membrane i uronjeni zajedno s gelom u pufer za prijenos neposredno prije slaganja na spužvicu. Slaganje kazete za prijenos započinje rastvaranjem kazete (*Slika 3a.*). Na stranicu koja će biti okrenuta prema negativnoj elektrodi u samu sredinu stavljena je spužvica koja je dobro namočena puferom i iz koje je istisnut zrak, a na spužvicu su dodana 2 komada navlaženog filter papira (*Slika 3b.*) (staklenim štapićem pažljivo se provalja površina kako bi se istisnuo zrak). Na filter papir postavljen je gel (*Slika 3c.*) (leđima prema gore) kako bi se membrana potpuno priljubila uz ravnu stranu gela. Gornji lijevi ugao gela odrezan je kako bi se označio poredak uzoraka na membrani. Potom je membrana pažljivo položena tako da se odrezani rubovi poklope i ponovljena je procedura pažljivog istiskivanja zraka staklenim štapićem. Na membranu su dodana 2 komada navlaženog filter papira (ponoviti istiskivanje zraka) i potom spužvica. Tako posloženi dijelovi zatvoreni su drugom stranicom kazete koja je potom okrenuta prema pozitivnoj elektrodi. Posuda za prijenos proteina napunjena je do oznake hladnim puferom i uronjena je pripremljena zatvorena kazeta (*Slika 4.*). Potom je posuda napunjena puferom do vrha i priključena na izvor električne struje. Prijenos proteina na membranu proveden je pri 200 mA tijekom 1,5 h (21) (*Slika 5.*).

Tablica 6. Priprema pufera za prijenos

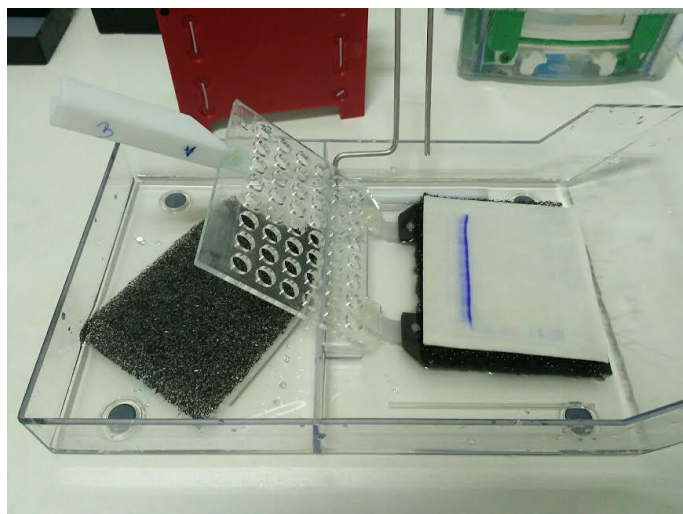
Pufer za prijenos pH 8,3	
TRIS	25 mM
Glicin	192 mM
Metanol	10 %



Slika 3a. Slaganje kazete za prijenos proteina, dodavanje spužvice



Slika 3b. Slaganje kazete za prijenos proteina, dodavanje filter papira



Slika 3c. Slaganje kazete za prijenos proteina, dodavanje gela



Slika 4. Prikaz uranjanja složene kazete u posudu za prijenos



Slika 5. Prikaz procesa prijenosa proteina na membranu pri 200 mA

4.2.6. Imunodetekcija proteina na membrani

Nakon prijenosa proteina na membranu, prisutnost traženih proteina određena je pomoću protutijela. Korištena su primarna i sekundarna protutijela (*Tablica 8.*). Primarna su protutijela visoko specifična za traženi protein, te se na njih vežu sekundarna protutijela koja su u kompleksu s enzimom. Enzim omogućuje vidljivost signala i način detekcije. Najčešće korišteni enzimi jesu alkalna fosfataza i peroksidaza iz hrena, koji se koriste za kolorimetrijsku ili kemiluminiscentnu reakciju. Dodatkom kromogenog spoja enzimu, dolazi do enzimske reakcije i nastaje obojeni talog na mjestu vezanja protutijela. Dodavanjem kemiluminiscencijskog supstrata, npr. peroksidaze dolazi do emisije svjetla na onim mjestima na koja su vezana sekundarna protutijela, te se ta mjesta vide kao zatamnjene pruge. Sekundarna protutijela moraju odgovarati vrsti organizma iz koje su dobivena primarna protutijela (npr. za detekciju primarnih protutijela iz miša koriste se sekundarna protu-mišja protutijela) (21, 22).

POSTUPAK :

Membrana se inkubirala u puferu II preko noći u hladnoj komori s primarnim protutijelima koja su razrijeđena puferom u omjeru koji ovisi o vrsti protutijela (pripremljeno prema uputama proizvođača). Membrana se ispirala u puferu I 5 minuta uz tri promjene pufera (*Tablica 7.*). Nakon ispiranja membrana se inkubirala sa sekundarnim protutijelima (pripremljena prema uputama proizvođača). Nakon inkubacije sekundarnim protutijelima slijedio je postupak ispiranja membrane. U ovom radu koristila su se sekundarna protutijela u kompleksu s peroksidazom iz hrena te se membrana inkubirala u 10 mL otopine DAB kojoj je dodano 10 μ L 30 % H_2O_2 . Nakon nekoliko minuta na mjestu reakcije nastalo je smeđe obojenje, potom se bojanje prekinulo ispiranjem membrane u vodi, a membrana se osušila na zraku (21).

Tablica 7. Priprema TBS pufera

TBS pufer – 10x STOCK, pH 7,5	
Tris – HCl	20 mM
NaCl	150 mM

Pufer za ispiranje – mješavina tris puferirane fiziološke otopine i spoja Tween 20

(engl. *mixture of tris-buffered saline (TBS) and Tween 20, TBST*) – 0,1 % Tween 20 u TBS puferu

Pufer za blokiranje – 5 % nemasno mlijeko u prahu ili 5 % goveđi serumski albumin (engl. *bovine serum albumin, BSA*) u TBST puferu

Pufer I : 0,1 % Tween 20 u TBS puferu

Pufer II : 5 % reagens za blokiranje u puferu I

Supstrat za detekciju proteina kolorimetrijskom metodom pomoću enzima peroksidaze: otopina 3,3–diaminobenzidin tetrahidroklorid(engl. *3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB*) u 50 mM Tris – HCl (pH 7, 6)

Tablica 8. Priprema primarnog i sekundarnog protutijela

Primarno protutijelo	Uzgojeno u	Proizvođač	Razrjeđenje
<i>p53</i>	zecu	Cell signalling Technology	1 : 1000 u 5 % w/v BSA, 1xTBS, 0,1 % Tween20
Akt	zecu	Cell signalling Technology	1 : 1000 u 5 % w/v BSA, 1xTBS, 0,1 % Tween20
GAPDH	zecu	Cell signalling Technology	1 : 5000 u 5 % mlijeko prahu, 1xTBS, 0,1 % Tween20
Sekundarno protutijelo / IgG – HRP obilježeno	zecu	Cell signalling Technology	1 : 2000 u 5 % mlijeko u prahu, 1xTBS, 0,1 Tween20

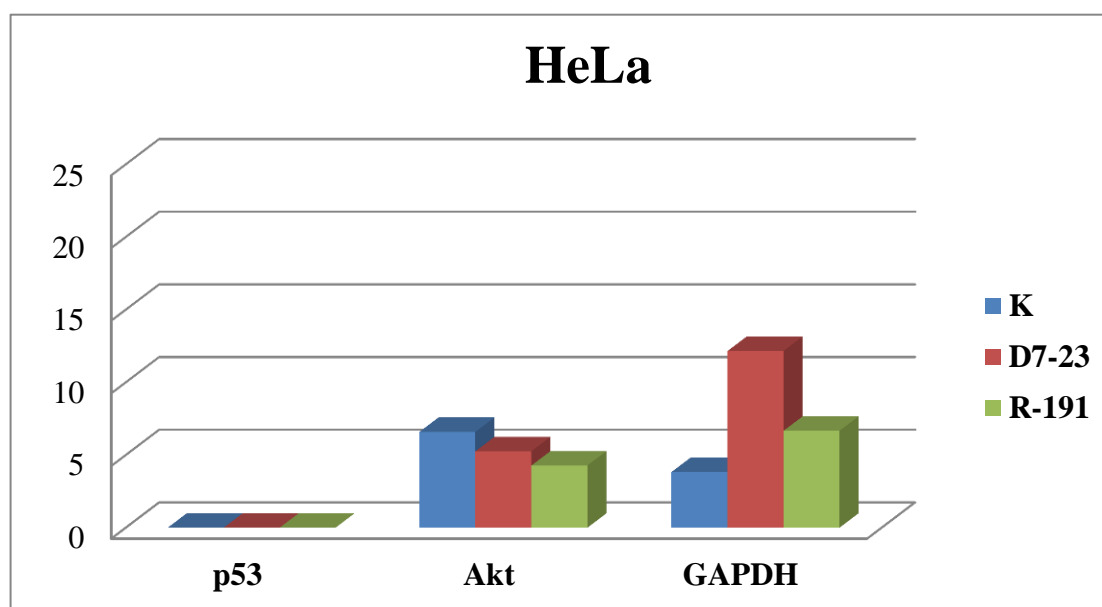
4.2.7. Relativna kvantifikacija proteina na membrani

Pomoću Programa ImageJ napravljena je relativna kvantifikacija dobivenih vrpca proteinskih uzoraka na membrani.

5. REZULTATI

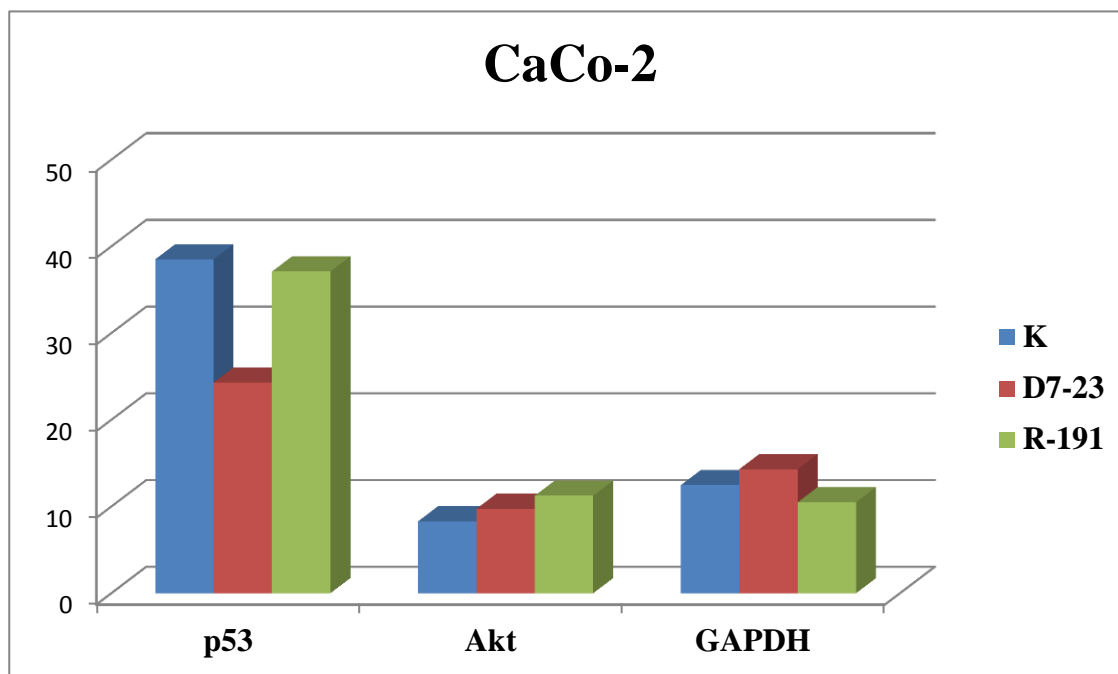
Razina ekspresije proteina p53, Akt i GAPDH u staničnim linijama HeLa, CaCo-2, NCI-H358, K562 i Raji prikazana je grafički. Za interpretaciju rezultata bitno je uočiti razinu ekspresije proteina Akt, p53 u odnosu na kontrolni protein GAPDH u ispitivanim staničnim linijama. Svaka slika sadrži rezultate za pojedinu staničnu liniju pri čemu su prikazani rezultati dobiveni na kontrolnim, netretiranim stanicama i stanicama izloženim spojevima D7-23 i R-191.

Dobiveni rezultati pokazuju da ekspresija p53 proteina u HeLa staničnoj liniji nije prisutna, dok je ekspresija Akt proteina u odnosu na kontrolni protein GAPDH snižena u svim stanicama (*Slika 6.*). Uočena je i podjednaka relativna kvantitativna ekspresija Akt proteina u HeLa stanicama nakon tretmana s D7-23 i R-191 derivatima (*Slika 6.*).



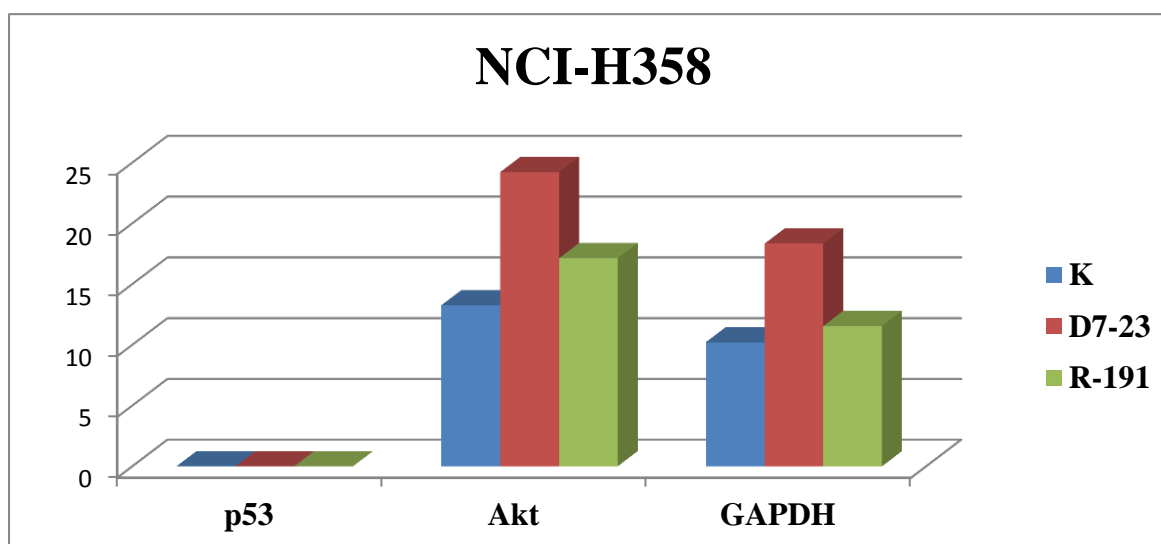
Slika 6. Prikaz rezultata za HeLa staničnu liniju

U CaCo-2 staničnoj liniji prisutna je ekspresija svih proteina. U odnosu na kontrolni protein GAPDH ekspresija proteina p53 je izrazito povišena kod stanica tretiranih spojevima D7-23, R-191, ali i kod kontrolnih, netretiranih stanica. Ekspresija proteina Akt niža je u stanicama tretiranim spojem D7-23 i kontrolnim, netretiranim stanicama, dok je prisutna povišena razina ekspresija u odnosu na kontrolni protein kod tretmana spojem R-191 (*Slika 7.*).



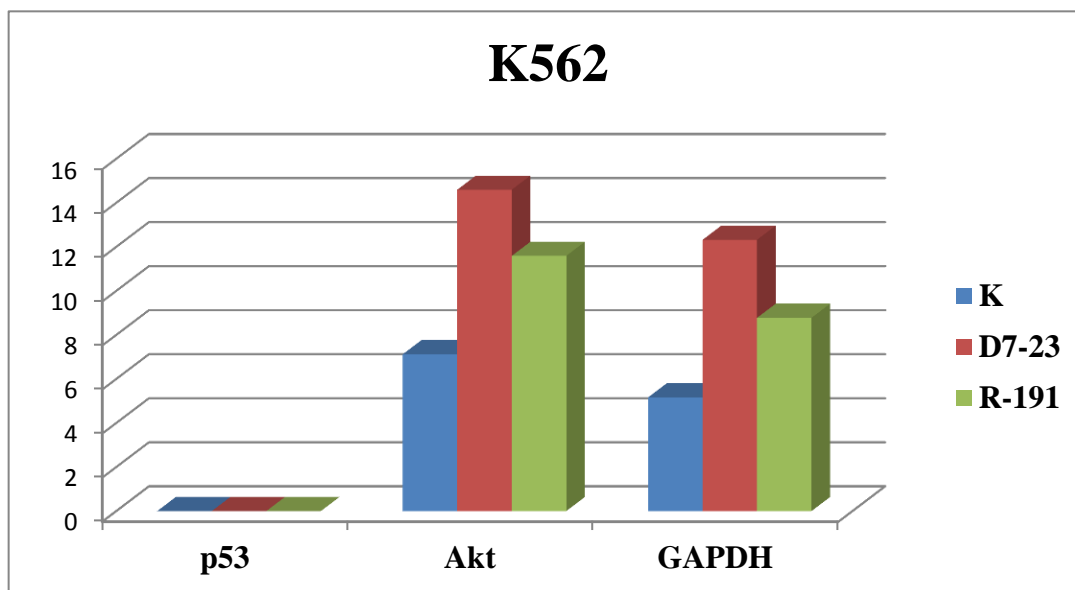
Slika 7. Prikaz rezultata za CaCo-2 staničnu liniju

U staničnoj liniji NCI-H358 nije prisutna ekspresija proteina p53. Ekspresija proteina Akt veća je u odnosu na kontrolni protein GAPDH i u kontrolnim i u tretiranim staničnim linijama (*Slika 8.*). Zabilježena je povišena ekspresija Akt proteina nakon tretmana s D7-23 i R-191 derivatima u odnosu na kontrolne netretirane stanice (*Slika 8.*).



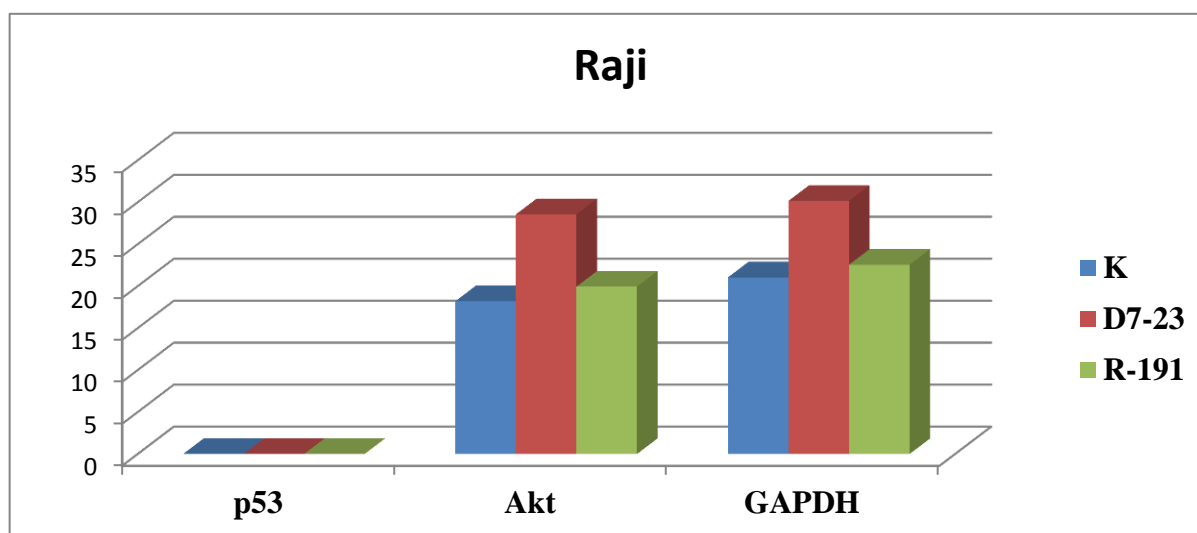
Slika 8. Prikaz rezultata za NCI-H358 staničnu liniju

U staničnoj liniji K562 nije prisutna ekspresija proteina p53. Ekspresija proteina Akt veća je u odnosu na kontrolni protein GAPDH prije i nakon tretmana D7-23 i R-191 (*Slika 9.*).



Slika 9. Prikaz rezultata za K562 staničnu liniju

U staničnoj liniji Raji nije prisutna ekspresija proteina p53, dok je ekspresija proteina Akt manja u odnosu na kontrolni protein GAPDH u tretiranim i kontrolnim staničnim modelima (*Slika 10.*).



Slika 10. Prikaz rezultata za Raji staničnu liniju

6. RASPRAVA

Ciljevi ovog istraživanja bili su odrediti moguće promjene u ekspresiji GAPDH, Akt i p53 proteina u staničnim kulturama HeLa, CaCo-2, NCI-H358, K562 i Raji prilikom tretmana s purinskim derivatima *N*-sulfonilurea D7-23 i R-191, ali i usporediti dobivene rezultate s ekspresijom tih proteina u kontrolnim, netretiranim stanicama. Pretpostavljalo se da će razina ekspresije proteina GAPDH, Akt i p53 u HeLa, CaCo-2, NCI-H358, K562 i Raji staničnim kulturama izloženima ispitivanim purinskim derivatima *N*-sulfonilurea biti promijenjena.

Prema dobivenim rezultatima u HeLa staničnoj liniji nije zabilježena ekspresija proteina p53 što nije u skladu s očekivanjima, jer se u literaturi navodi da se p53 nalazi u tim stanicama (17, 18). Pretpostavlja se da, iako je prisutan p53 u uzorcima, nije uočen zbog činjenice da je prisutan virusni protein E6 koji ga inaktivira (23), ali i zbog moguće manje osjetljivosti metode i bojanja s diaminobenzidinom (DAB). Ekspresija proteina Akt u netretiranim HeLa stanicama veća je nego nakon tretmana spojevima spojevima D7-23 i R-191. Navedeni rezultati upućuju na povećanu osjetljivost signalnog puta Akt proteina nakon tretiranja HeLa stanica testnim spojevima, što upućuje na njihovo potencijalno antitumorsko djelovanje (8).

U CaCo-2 staničnoj liniji prisutna je ekspresija svih proučavanih proteina. U odnosu na ekspresiju kontrolnog GAPDH proteina, ekspresija proteina p53 izrazito je povišena, neovisno o tretmanu stanica s derivatima *N*-sulfonilurea, što je u skladu s prethodnim istraživanjima (19) da je u CaCo-2 staničnoj liniji prisutna ekspresija p53 proteina unatoč mutiranosti i inaktivnosti gena. Rezultati pokazuju značajnu razliku između kontrolnih, netratiranih stanica i stanica tretiranih spojem D7-23 što nije u skladu s očekivanjima, a uzrok tome može biti slabije osjetljiva metoda. Ekspresija proteina Akt niža je u odnosu na kontrolni GAPDH protein osim u stanicama koje su tretirane R-191 spojem. Nije opažena značajna promjena u ekspresiji Akt proteina nakon tretmana CaCo-2 stanica testnim spojevima u odnosu na netretirane stanice, što upućuje da signalni put Akt proteina nije osjetljiv na djelovanje ispitivanih derivata.

Dobiveni rezultati za staničnu liniju NCI-H358 pokazali su da nije prisutna ekspresija proteina p53, što je u skladu s prethodnim istraživanjima (12, 14, 15, 16). Ekspresija proteina Akt veća je u odnosu na kontrolni protein GAPDH, u tretiranim i netretiranim NCI-H358 staničnim linijama. Štoviše, stanice izložene spojevima D7-23 i R-191, pokazuju povećanu ekspresiju Akt proteina u odnosu na netretirane, kontrolne NCI-H358 linije, što je u skladu s

hipotezom. Ističe se tretman spoja R-191 koji je uzrokovao umjereno povišene vrijednosti ekspresije Akt proteina u odnosu na kontrolne stanice. Navedeni rezultati upućuju da signalni put Akt proteina u NCI-H358 stanicama nije osjetljiv na potencijalne protutumorske učinke derivata *N*-sulfoniluree.

Nadalje, ekspresija proteina p53 nije zabilježena u staničnoj liniji K562, što je u skladu s prethodnim istraživanjima (14, 15). Nasuprot tome, ekspresija proteina Akt veća je u odnosu na kontrolni protein GAPDH prije i nakon tretmana spojevima D7-23 i R-191. Značajnije povišenje vrijednosti ekspresije proteina prisutne su pri tretmanu s D7-23, no unatoč tome, prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da na signalni put proteina Akt nije bitnije utjecao tretman spojevima D7-23 i R-191.

Niti u Raji staničnoj liniji nije zabilježena ekspresija proteina p53, što se moglo pretpostaviti s obzirom na korištenu metodu slabije osjetljivosti (DAB ekspresija), dok su prethodna istraživanja (13) pokazala da je prisutan nemutirani oblik *p*53, ali u manjoj mjeri. Razina ekspresije Akt proteina nije značajno različita u odnosu na kontrolni GAPDH protein u ispitivanim Raji staničnim linijama. Značajno povećanje Akt ekspresije, pak, vidljivo je u D7-23 tretiranih stanica u odnosu na netretirane Raji linije. Značajan učinak R-191 spoja na Akt ekspresiju u Raji stanicama nije zabilježen. Istraživanje bi trebalo nastaviti, ponoviti više puta s istom metodom kako bi se mogla dobiti i statistička analiza rezultata, ali isto tako proširiti ga drugim metodama koje bi omogućile precizniju kvantifikaciju rezultata i olakšale donošenje zaključaka.

7. ZAKLJUČAK

1. Na osnovi dobivenih rezultata može se zaključiti da je razina ekspresije proteina GAPDH, Akt i p53 u HeLa, CaCo-2, NCI-H358, K562 i Raji staničnim kulturama izloženim ispitivanim purinskim derivatima *N*-sulfonilurea, D7-23 i R-191, promijenjena u odnosu na kontrolne, netretirane stanice.
2. Izostanak ekspresije proteina p53 u HeLa i Raji staničnoj kulturi koje nisu u skladu s literaturom, može se pripisati korištenju manje osjetljive metode i bojanja s diaminobenzidinom (DAB), ali i potencijalno E6-posredovanoj razgradnji p53 proteina u HeLa staničnoj kulturi.
3. Istraživanje je potrebno nastaviti, ali i proširiti upotrebom drugih metoda koje će upotpuniti kvantifikaciju rezultata i olakšati donošenje konačnog zaključka.

8. SAŽETAK

Uvod : Tumorske bolesti, kao vodeći uzrok smrtnosti u svijetu, nameću potrebu za pronalaskom učinkovite antitumorske terapije. Većina antitumorskih lijekova nije ciljno specifična te napadaju i zdrave stanice. Novosintetizirani spojevi *N*-sulfoniluree koji su korišteni u ovom istraživanju pripadaju grupi antimetabolita koji postižu ciljnu specifičnost kroz interakciju s prirodnim metabolitima.

Cilj istraživanja bio je odrediti moguće promjene ekspresije p53, Akt i GAPDH proteina u staničnim kulturama HeLa, CaCo-2, NCI-H358, K562 i Raji nakon tretmana spojevima D7-23 i R-191 *N*-sulfoniluree, ali i usporediti rezultate ekspresije proteina kod tretiranih i ne tretiranih stanica (kontrolna točka).

Materijali i metode : Nakon 24-satnog tretmana, stanice su lizirane, a stanični proteini izolirani. Prisustvo analiziranih proteina p53, Akt i GAPDH određeno je Western blot metodom uz korištenje p53, Akt i GAPDH protutijela. Relativna kvantifikacija proteina na membrani napravljena je uz pomoć ImageJ programa.

Rezultati : Western blot analize su pokazali promjene u ekspresiji p53, Akt i GAPDH proteina prije i nakon tretmana komponentama D7-23 i R-191 *N*-sulfonilurea. Značajna promjena u ekspresiji nakon tretmana s D7-23 i R-191 prisutna je kod proteina Akt u HeLa staničnoj liniji.

Zaključak : Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti da su testne komponente pokazale potencijalno antitumorsko djelovanje na Akt signalni put u HeLa staničnoj liniji.

Ključne riječi: tumorske bolesti, *N*-sulfonilurea, spoj D7-23, R-191, p53, Akt, GAPDH, Western blot

9. SUMMARY

Introduction: Tumour diseases are a leading cause of death worldwide and there is a need to discover efficient form of tumour treatment. Most of anticancer drugs are not target-specific, thus affecting normal cells as well. Newly synthesized *N*-sulfonylureas derivatives that were used in this research belong to the group of antimetabolites that achieve specific effects through interaction with natural metabolites.

Objectives: The aim of this study was to determine possible changes in the expression of the p53, Akt and GAPDH protein in HeLa, CaCo-2, NCI-H358, K562 and Raji cell lines after the treatment with test compounds D7-23 and R-191 *N*-sulfonylureas. The aim was also to compare expression of proteins in treated and nontreated cells (control point).

Material and Methods: After 24 hours of treatment, cells were lysed and cellular proteins were isolated. Presence of p53, Akt and GAPDH proteins in total isolated cellular proteins was determined by Western blot method using p53, Akt and GAPDH antibodies. Relative quantification of the Akt protein obtained on the membrane was made with the ImageJ program.

Results: Results of Western blot analysis showed change in expression level of p53, Akt and GAPDH proteins before and after the treatment with test compounds D7-23 and R-191 *N*-sulfonylureas. Significant change in expression level is presented in expression of Akt protein in HeLa cell line. Obtained results suggest that test compounds indicate potential antitumour activity.

Key words : tumour diseases, *N*-sulfonylureas, compounds D7-23, R-191, p53, Akt, GAPDH, Western blot.

10. LITERATURA

1. Leović J, Protutumorski učinci novih N-9 sulfonilpurina [diplomski rad]. Osijek: Sveučilište J.J. Strossmayera, Medicinski fakultet; 2016.
2. Šlaus-Pećina N, Jakuš-Bulić F, Radić K. Tumor supresorski geni [nastavni tekst]. Zagreb: Zavod za biologiju, Medicinski fakultet; 2005.
3. Žinić B., Krizmanić I., Glavaš-Obrovac LJ., Karner I, Žinić M. Synthesis and Antitumor Activity of N-Sulfonyl Derivatives of Nucleobases and Sulfonamido Nucleoside Derivatives. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2003; 22(5-8): 1623-1625.
4. Savić D, Stanković T, Lavrnja I, Podolski-Renić A, Banković J, Peković S, i sur. Purine nucleoside analogs in the therapy of cancer and neuroinflammation. *Molecular inhibitors in targeted therapy*. 2015; 1(1).
5. GAPDH glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Homo sapiens (human) Gene ID: 2597, updated on 6-Aug-2017.
6. Zhang YY, Zhang F, Hong CQ, Giuliano AE, Cui XJ i sur. Critical protein GAPDH and its regulatory mechanisms in cancer cells. *Cancer Biol Med*. 2015; 12(1): 10.
7. Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal*. 2002; 14(5): 381-395.
8. Box HA, Sun-Myoung K, Demetrick DJ. AKT loss in human epithelial cells treated with severe hypoxia. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 803(8): 951-959.
9. Busserolles J, Megias J, Terencio MC, Alcaraz MJ. Heme oxygenase-1 inhibits apoptosis in CaCo-2 cells via activation of Akt pathway. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006; 38(9): 1510-1517.

10. National Center for Biotechnology Information (US). Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 1998.

Dostupno na adresi <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22268/>

11. Kralj M, Husnjak K, Korbler T, Pavelić J. Endogenous p21WAF1/CIP1 status predicts the response of human tumor cells to wild-type p53 and p21WAF1/CIP1 overexpression. *Cancer Gene Ther.* 2003; 10(6): 457.

12. Takahashi T, Carbone D, Takahashi T, Nau M, Tokoyaki I, Linnoila I i sur. Wild-type but not Mutant p53 Suppresses the Growth of Human Lung Cancer Cells Bearing Multiple Genetic Lesions. *Cancer Research.* 1992; 52(8), 2340-2343.

13. Henrich S, Christopherson RI, Multiple forms of nuclear p53 formed in human Raji and MEC1 cells treated with fludarabine. *Leukemia.* 2008; 22(3), 657.

14. Law JC, Ritke MK, Yalowich JC, Leder GH, Ferrel RE, Mutational inactivation of the p53 gene in the human erythroid leukemic K562 cell line. *Leuk Res.* 1993; 17(12): 1045-1050.

15. Feinstein E, Gale RP, Reed J, Canaani E. Expression of the normal p53 gene induces differentiation of K562 cells. *Oncogene.* 1992; 7(9): 1853-1857.

16. Sang-Mi W, Youn KC, Ah Jeong K, Sung-Gook C, Seon-Gyu K. p53 causes butein-mediated apoptosis of chronic myeloid leukemia cells. *Mol Med Rep.* 2016;13(2): 1091–1096.

17. Hietanen S, Lain S, Krausz E, Blattner C, Lane DP. Activation of p53 in cervical carcinoma cells by small molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2000; 97(15): 8501-8506.

18. Chen ZP, Yeung DC, Regulation of p53 expression in HeLa cells. *Biochem Mol Biol Int.* 1996; 38(3): 607-616.

19. Ramesh M. Ray, Shirley A. McCormack, Leonard R. Johnson, Polyamine depletion arrest growth of IEC-6 and CaCo-2 cells by different mechanisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001; 281(1): G37-G43.
20. Dodig S. *Imunokemija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2015.
21. Ambriović Ristov, A., *Metode u molekularnoj biologiji*. Zagreb: Institut Ruđer Bošković; 2007.
22. Murray RK, Bender DA, Botham K, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. *Harperova ilustrirana biokemija*. 28. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.
23. Ajay A.K., Meena A.S., Bhat M.K. Human papillomavirus 18 E6 inhibits phosphorylation of p53 expressed in HeLa cells. *Cell Biosci.* 2012; 2(1): 2.

11. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 12. 6. 1994. u Slavonskom Brodu. Završio sam osnovnu školu „Antun Mihanović“, nakon koje i opću gimnaziju „Matija Mesić“ u Slavonskom Brodu. 18. 7. 2014. godine započeo sam svoj akademski put upisavši preddiplomski studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu u Osijeku. U svibnju 2017. godine sudjelovao sam na trećoj međunarodnoj Cholnoky konferenciji. Trenutno završavam 3. godinu studija.